



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 19 967 A 1**

②① Aktenzeichen: 100 19 967.4
②② Anmeldetag: 20. 4. 2000
②③ Offenlegungstag: 25. 10. 2001

⑤ Int. Cl. 7:
C 07 K 16/00
C 07 K 14/435
A 61 K 38/17
C 12 N 1/21
C 12 N 15/13
C 07 H 21/00
C 12 N 15/11
C 12 S 3/00
C 12 Q 1/00

DE 100 19 967 A 1

⑦① Anmelder:
Dr. Fenning BioMed GmbH, 79199 Kirchzarten, DE

⑦④ Vertreter:
Patent- und Rechtsanwaltssozietät Maucher, Börjes
& Kollegen, 79102 Freiburg

⑦② Erfinder:
Terness, Peter, Priv.-Doz. Dr., 69124 Heidelberg, DE;
Kleist, Christian, Dipl.-Biol., 69221 Dossenheim, DE;
Opelz, Gerhard, Prof. Dr., 69118 Heidelberg, DE;
Welschhof, Martin, Dipl.-Biol. Dr., 69120 Heidelberg,
DE; Arnold-Schild, Danièle, Dr., 72108 Rottenburg,
DE; Schild, Hansjörg, Dr., 72108 Rottenburg, DE;
Rammensee, Hans-Georg, Prof., 72070 Tübingen,
DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Antikörper gegen natives gp96, deren Herstellung und Verwendung
- ⑤⑦ Die Erfindung betrifft rekombinante Antikörper gegen natives gp96, Verfahren zu deren Herstellung, ihre Verwendung, Trennmaterialien, Vorrichtungen und Kits, die die genannten Antikörper umfassen, an natives gp96 gebundene Peptide und deren Isolierung, Nucleinsäuresequenzen, die die genannten rekombinanten Antikörper codieren, und Wirtszellen, die die genannte DNA beinhalten und die Herstellung entsprechender Antikörper ermöglichen.

BEST AVAILABLE COPY

DE 100 19 967 A 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft rekombinante Antikörper gegen natives gp96, Verfahren zu deren Herstellung, ihre Verwendung, Trennmaterien, Vorrichtungen und Kits, die die genannten Antikörper umfassen, an natives gp96 gebundene Peptide und deren Isolierung, Nucleinsäuresequenzen, die die genannten rekombinanten Antikörper codieren, und Wirtszellen, die die genannte DNA beinhalten und die Herstellung entsprechender Antikörper ermöglichen, sowie weitere unten beschriebene Aspekte.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Das zur Gruppe der Hitzeschock-Proteine ("heat shock proteins") gehörende gp96 ist ein Protein, welches in der Lage ist, im Endo-plasmatischen Retikulum (ER) mit Peptiden zu assoziieren und so mit diesen einen immunogenen Kontext zu bilden. Werden solche gp96/Peptid-Komplexe in Mäuse injiziert, können starke Immunantworten induziert werden. Diese Immunantworten sind spezifisch für die assoziierten Peptide, wie durch Induktion spezifischer Antworten durch cytotoxische T-Lymphozyten belegt werden kann. Die hohe Effektivität insbesondere von gp96 ist möglicherweise durch die Tatsache erklärbar, dass antigenpräsentierende Zellen (z. B. Makrophagen, dendritische Zellen) Rezeptoren tragen, die spezifisch sind für Hitzeschock-Proteine und ihre effiziente Aufnahme ermöglichen. Basierend auf diesen Anwendungen können Hitzeschockproteine zur Krebs-Immuntherapie in Mäusen verwendet werden (siehe Tamura et al., Science 278, 117-120 (1994)). Weiter erscheinen sie als ideale Adjuvantien für auf individuelle Patienten massgeschneiderte Immunotherapie-Protokolle.

[0003] Um diese vielversprechenden Anwendungen zu ermöglichen, ist es jedoch erforderlich, das entsprechende Hitzeschock-Protein aus einer begrenzten Menge von Probenmaterial in sehr hoher Reinheit und in nativer Form zu erhalten. Hochspezifische monoklonale Antikörper (mAb), im Falle von gp96 gegen dieses Molekül, wären hierfür das ideale Hilfsmittel. Die bisher durch herkömmliche Immunisierungsprotokolle hergestellten Antikörper sind jedoch von sehr begrenzter Eignung, da sie nur schwach mit dem nativen gp96 reagieren – möglicherweise, weil das native gp96 in den zur Immunisierung verwendeten Tieren intrazellulär im ER vorliegt, die im resultierenden B-Zell-Hybridom vorliegenden Antikörper jedoch ebenfalls im ER vorliegen und so eine Interferenz mit der normalen gp96-Funktion in den Hybridomzellen durch Reaktion von nativem gp96 mit dem gebildeten Antikörper vorliegt, die die entsprechenden Hybridomzellen nicht ihre Funktion wahrnehmen lässt.

[0004] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Antikörper zur Verfügung zu stellen, welche die praktisch ausschließliche Erkennung von nativem gp96 ermöglichen. Durch Verwendung rekombinanter Antikörper konnte nun diese Aufgabe gelöst werden.

Überblick über die Erfindung

[0005] Die vorliegende Offenlegung beschreibt die Konstruktion antigen-bindender Domänen von gp96-spezifischen Antikörpern ausgehend von einer semi-synthetischen Immunglobulinen-Bibliothek. Die resultierenden Einzelketten-Antikörper (scFv Abs) werden für eine rasche Ein-Schritt-Methode zur chromatographischen Reinigung für die Isolierung von gp96-Molekülen verwendet. Diese sind immer noch in der Lage, spezifische Immunantworten auszulösen, wie native gp96-Moleküle, die mittels aufwendigerer konventioneller Protokolle gewonnen werden, bei denen ConA-Sepharose-Säulenchromatographie und weitere Reinigungsschritte Einsatz finden. Die ConA-Sepharose-Behandlung führt zu einer Kontaminierung mit ConA infolge von "Säulenbluten". Da ConA ein T-Zell-Mitogen ist, kann es störend mit dem Immunsystem einer zu impfenden Person oder eines zu impfenden Tieres interferieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Proteasen, wie Cathepsin E, in auf konventionelle Weise gereinigten gp96-Präparationen enthalten sind. All die potentiellen Risiken, die wegen der Kontaminationen von gp96 vorliegen, können vermieden werden durch Verwendung der erfindungsgemässen Affinitätsreinigung mittels rekombinanter scFv-Antikörper. Ausserdem beschleunigen diese den Reinigungsprozess und erlauben die Prozessierung kleiner Tumorproben. Diese Merkmale machen die rekombinanten anti-gp96-Antikörper zu einem idealen Werkzeug für die Reinigung von gp96, das dann auch selbst in der Behandlung eingesetzt werden kann, beispielsweise von Krebs und Infektionserkrankungen.

Abbildungen

(für weitere Details siehe auch Beispiele)

[0006] Fig. 1 zeigt die Sequenzanalyse der rekombinanten scFv-Antikörper. Es werden die Aminosäuresequenzen der V_H- und der V_L-Kettenabschnitte gezeigt. Die V_H-Segmente der B10C-, G12D- und H11B-Klone gehören zur V_H1-Genfamilie und sind vom Keimbahngen DP-3 derivatisiert. Die V_L-Gensegmentsequenzen sind identisch in allen Klonen und passen zum V₂3-Gensegment IGLV3S1 /DPL16. Die bestimmten V_H- und V_L-Sequenzen wurden verglichen mit Sequenzen aus der V Base (Medical Research Council, Cambridge, U. H.), der GenBank und der EMBL-Sequenzdatenbank. Gezeigt werden jeweils die variablen V_H- und V_L-Regionen der schweren und leichten Kettenabschnitte; (FR = Gerüstregion; CDR = Komplementaritätsdeterminierende Region). Die Unterbrechungen innerhalb der Sequenzdarstellung jeweils innerhalb der Sequenz der schweren und der leichten Kette sollen nicht fehlende Bindung bedeuten, sondern nur ermöglichen, unterschiedliche Abschnitte (FR1, CDR1 etc.) leichter zu erkennen. Tatsächlich bilden jeweils die Abschnitte FR1 bis FR4 der schweren und FR1' bis FR4' der leichten Kette eine zusammenhängende Kette. Es bedeuten (im Einbuchstabencode für Aminosäuren): Schwere Kette:
Bei Klon B10C: CDR3 = MPVVSQMPH = SEQ ID NO: 1; CDR2 = LVDPEDGETTYAEKFQG = SEQ ID NO: 4; CDR1 = DYYMH = SEQ ID NO: 5. Gesamtsequenz von Anfang FR1 bis Ende FR4 = SEQ ID NO: 10.
Bei Klon G12D: CDR3 = IPLFGRDH = SEQ ID NO: 2; CDR2 = LVDPEDGETTYAEKFQG = SEQ ID NO: 4; CDR1 =

DYYMH = SEQ ID NO: 5. Gesamtsequenz von Anfang FR1 bis Ende FR4 = SEQ ID NO: 11.

Bei Klon H11B: CDR3 = LAAGN = SEQ ID NO: 3; CDR2 = LVDPEIDGETTYAFKIQG = SEQ ID NO: 4; CDR1 = DYYMY = SEQ ID NO: 6. Gesamtsequenz von Anfang FR1 bis Ende FR4 = SEQ ID NO: 12.

Leichte Kette:

Bei allen drei Klonen: CDR1' = QGDSLRSYYAS = SEQ ID NO: 7; CDR2' = GKNNRPS = SEQ ID NO: 8; CDR3' = NSRDSSGNHVV = SEQ ID NO: 9. Gesamtsequenz von Anfang FR1' bis Ende FR4' = SEQ ID NO: 13.

[0007] Fig. 2: Diese Abbildung zeigt die den Aminosäuresequenzen in Fig. 1 zugrundeliegenden DNA-Sequenzen. Über den codierenden Triplets ist jeweils der Beginn der Gerüst- und komplementaritätsdeteminierenden Regionen (FR1, CDR1 etc.) angegeben.

Codieren der Abschnitt für Schwere Kette:

Bei Klon B10C:

CDR3 = ATG CCG GTT AGT CAG ATG CCT CAT = SEQ ID NO: 14;

CDR2 = CTT GTT GAT CCT GAA GAT GGT GAA ACA ATA TAC GCA GAG AAG TTC

CAG GGC = SEQ ID NO: 17;

CDR1 = GAC TAC TAC ATG CAC = SEQ ID NO: 18.

Gesamtsequenz von Anfang FR1 bis Ende FR4 = SEQ ID NO: 23.

Bei Klon G12D:

CDR3 = ATT CCG TTG TTT GGG CGG GAT CAT = SEQ ID NO: 15;

CDR2 = CTT GTT GAT CCT GAA GAT GGT GAA ACA ATA TAC GCA GAG AAG TTC

CAG GGC = SEQ ID NO: 17;

CDR1 = GAC TAC TAC ATG CAC = SEQ ID NO: 18.

Gesamtsequenz von Anfang FR1 bis Ende FR4 = SEQ ID NO: 24.

Bei Klon H11B:

CDR3 = CTT GCT GCT GGT AAT = SEQ ID NO: 16;

CDR2 = CTT GTT GAT CCT GAA GAT GGT GAA ACA ATA TAC GCA GAG AAG TTC

CAG GGC = SEQ ID NO: 17;

CDR1 = GAC TAC TAC ATG TAC = SEQ ID NO: 19.

Gesamtsequenz von Anfang FR1 bis Ende FR4 = SEQ ID NO: 25.

Leichte Kette: Bei allen drei Klonen:

CDR1' = CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT TAT GCA AGC = SEQ ID NO: 20;

CDR2' = GGT AAA AAC AAC CGG CCC TCA = SEQ ID NO: 21;

CDR3' = AAC TCC CGG GAC AGC AGT GGT AAC CAT GTG GTA = SEQ ID NO: 22.

Gesamtsequenz von Anfang FR1' bis Ende FR4' = SEQ ID NO: 26.

[0008] Fig. 3: Bindungsaktivität der rekombinanten Einzelketten (= Single Chain)-Fv-anti-gp96-Antikörper. Gereinigte scFv Abs werden auf die Bindung an Maus-gp96 untersucht, wobei auf einer Nitrocellulosemembran (1) unter reduzierenden Bedingungen (SDS plus β -Merkaptoethanol), (2) denaturierenden Bedingungen (SDS) und (3) nativen (PBS) Bedingungen untersucht wird. Die Membran wird mit monoklonalem Maus-IgG-Anti-Human-c-myc, polyklonalem Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-Anti-Maus-IgG und Substrat entwickelt. Der monoklonale Ratten-IgG-Anti-gp96-Antikörper (SPA-850) dient als positive, ein scFv-Oestradiol-Antikörper als negative Kontrolle. Alle rekombinanten scFv-Antikörper binden nur an das native Antigen. neg. ctr. = negative Kontrolle, pos.ctr. = positive Kontrolle.

[0009] Fig. 4: Präzipitation von nativem gp96 von Maus-Tumorzelllysaten. Hypotone Lysate radioaktiv markierter IGELa2-Zellen werden mit den genannten Antikörpern inkubiert, gefolgt von Protein-G-Sepharose-Präzipitation und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Kontrollbahn zeigt Präzipitation nur mit Protein-G-Sepharose alleine als Kontrolle. (1) = Kontrolle, (2) = Anti-BiP (SPA-847), (3) = Anti-gp96 (SPA-850), (4) = scFv (Klon H11B).

[0010] Fig. 5: Chromatographische Reinigung von nativen gp96-Molekülen. Hypotone Lysate von radiomarkierten IGELa2- und humanen CLR-Zellen werden mit rekombinanten anti-gp96-scFv-Antikörpern oder BSA als Negativkontrolle, jeweils immobilisiert auf Sepharose-Beads, inkubiert. Die Immunkomplexe werden durch SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese getrennt. (5) = BSA-Sepharose, (6) = Anti-gp96scFv-Sepharose, (7) = BSA-Sepharose, (8) = Anti-gp96scFv-Sepharose.

[0011] Fig. 6: Aktivierung von CTL durch scFv-gereinigte gp96-Moleküle. C57BL/6-Mäuse werden i. p. mit PBS (A), gp96 gebunden an anti-gp96-scFv-Sepharose (B), unbehandelte (C), gp96, gereinigt nach Standardmethoden (D), pH 10,5-eluierten gp96-Molekülen (E) und 1,3 M NaCl eluierten gp96-Molekülen immunisiert. Nach 9 Tagen werden Splenocyten mit bestrahlten BALB.B-Zellen während 5 Tagen inkubiert und die CTL-Aktivität auf C57BL/6 (gefüllte Kreise) und BALB.B (gefüllte Dreiecke) ConA-Blasts gemessen. (9) = % spezifische Lyse, (10) = E : T-Verhältnis.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0012] Die Erfindung betrifft rekombinante Antikörper, die natives gp96 binden, insbesondere solche, welche die dritte Komplementarität determinierende Region (CDR3) aus einem variablen Anteil einer schweren Kette eines Antikörpers gemäss SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 3 umfassen (Fig. 1), insbesondere solche, welche in Fig. 1 (a) die vom variablen Teil einer schweren Kette abgeleiteten Abschnitte CDR3 der Sequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 3; CDR2 der Sequenz SEQ ID NO: 4; und CDR1 der Sequenz SEQ ID NO: 5 (oder insbesondere SEQ ID NO: 6) und (b) die vom variablen Teil einer leichten Kette abgeleiteten Abschnitte CDR1' der Sequenz SEQ ID NO: 7, CDR2' der Sequenz SEQ ID NO: 8 und CDR3' der Sequenz SEQ ID NO: 9 umfassen.

[0013] Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der genannten rekombinanten Antikörper zur Reinigung oder Markierung von gp96.

[0014] Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der genannten rekombinanten Antikörper zur (raschen) Reinigung von intakten gp96/Peptid-Komplexen aus kleinen Mengen von Tumormaterial oder infizierten Zellen, die anschliessend

zur autologen oder ferner heterologen Immunotherapie verwendet werden können.

[0015] Die Erfindung betrifft auch gp96 mit gebundenen Peptiden, welches durch die oben beschriebene Reinigungsmethode gewinnbar ist bzw. vorzugsweise gewonnen worden ist, insbesondere zur Anwendung in einem Verfahren zur (vorzugsweise autologen) Immunisierung, sowie pharmazeutische Formulierungen, die einen nach der oben beschriebenen Reinigungsmethode gewinnbaren, insbesondere gewonnenen, gp96/Peptid-Komplex und ggf. weitere Trägermaterialien umfassen.

[0016] Die Erfindung betrifft auch gp96 mit gebundenen Peptiden nach dem letzten Absatz zur Anwendung in einem Verfahren zu therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers, insbesondere zur heterologen oder vor allem autologen Immunisierung; die Verwendung des entsprechenden gp96 mit gebundenen Peptiden zur Herstellung eines Arzneimittels zur (insbesondere autologen) Immunisierung bei Patienten, die an einer Tumorerkrankung oder einer Infektion leiden, sowie die Verwendung des entsprechenden gp96 mit gebundenen Peptiden zur Immunisierung dieser Patienten bzw. Methoden zur (insbesondere autologen) Immunisierung von Patienten mittels Verabreichung von gp96 gemäss dem vorausgehenden Absatz an einen Patienten, der an einer Tumorerkrankung oder einer Infektion leidet und einer derartigen Behandlung bedarf.

[0017] Die Erfindung betrifft auch die Isolierung von Peptiden, welche an natives gp96 aus Wamblüterzellen gebunden sind, insbesondere bei Wamblütern, die an einer Erkrankung leiden, z. B. einer Ischämie (etwa infolge eines Infarktes oder von Atherosklerose), einer Tumorerkrankung oder einer Infektion, sowie entsprechende Peptide, soweit sie neu sind, und deren Verwendung.

[0018] Die Erfindung betrifft auch Trennmaterialien (Matrices) und Vorrichtungen zur Reinigung von nativem gp96, die die erfindungsgemässen rekombinanten Antikörper umfassen.

[0019] Die Erfindung betrifft auch Kits zur Reinigung oder zum Nachweis von nativem gp96, welche die erfindungsgemässen rekombinanten Antikörper umfassen.

[0020] Die Erfindung betrifft auch Nucleinsäuresequenzen, insbesondere DNA-Sequenzen, welche für erfindungsgemässe rekombinante Antikörper kodieren.

[0021] Die Erfindung betrifft auch Wirtszellen, insbesondere Prokaryonten, wie E. coli, welche für erfindungsgemässe rekombinante Antikörper codierende Sequenzen umfassen.

[0022] Die vor- und nachsichend genannten allgemeinen Ausdrücke haben vorzugsweise die folgenden Bedeutungen, wenn nicht anders angegeben, wobei allgemeine Begriffe stets durch entsprechende speziellere Begriffe oder Beschreibungen ersetzt werden können, was zu bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung führt:

Ein rekombinanter Antikörper, der natives gp96 bindet, ist ein aus einer oder mehreren nichtkovalent oder kovalent miteinander verbundenen Peptidketten aufgebautes Protein, welches die an natives gp96 bindenden komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR) umfasst, wobei auch Glykosylierungen oder andere Derivatisierungen vorliegen können; es handelt sich insbesondere um in üblicher Weise aus einer schweren und einer leichten Kette, die beispielsweise über Disulfidbrücken oder auf andere Weise kovalent miteinander verbunden sind, aufgebaute Antikörper, oder vorzugsweise ein Fragment eines derartigen Antikörpers, insbesondere des F(ab)₂-Typs, oder insbesondere Einzelketten-Antikörper (sc Abs) mit allen komplementaritätsdeterminierenden Regionen auf einer Polypeptidkette, die noch weitere Sequenzen, wie Gerüstsequenzen, Linker-Sequenzen, Marker-Sequenzen (z. B. c-myc) oder Sequenzen, die eine spezifische Trennung erlauben, z. B. für IMAC (Immobilisiertes Metall-Affinitätschromatographie), umfassen kann und/oder auch als Aggregat von zwei oder mehr derartigen Ketten vorliegen kann, wie es häufig gefunden wird (sowohl die tatsächlichen Einzelketten als auch deren Aggregate sind nachfolgend gemeint, wenn von scFv-Antikörpern (Abs) die Rede ist) – das Minimum für derartige Einzelketten besteht aus den sogenannten Fv-Fragmenten, welches die hypervariablen Regionen der schweren und der leichten Antikörperkette umfassen (derartige Fv-Fragmente sind schwer durch proteolytische Techniken herzustellen, da die entsprechenden variablen Domänen nach Verdünnung zur Dissoziation tendieren). Auch Gemische solcher Antikörper sind möglich. Rekombinant bedeutet, daß mindestens ein Teil der Sequenz des entsprechenden Antikörpers durch Methoden der rekombinanten Gentechnologie modifiziert ist, wobei der entsprechende Antikörper auch auf enzymatischem oder chemischem Wege hergestellt werden kann oder vorzugsweise durch Expression geeigneter Nucleinsäuresequenzen in einem Wirtsorganismus.

[0023] Komplementaritätsdeterminierende Regionen (CDR) (auch hypervariable Regionen genannt) sind solche, die für die spezifische Bindung des jeweiligen rekombinanten Antikörpers an gp96 verantwortlich sind (die also den Idiotyp ausmachen).

[0024] Bevorzugt sind solche Antikörper, welche die dritte Komplementarität determinierende Region (CDR3) der schweren Kette eines Antikörpers gemäss SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 3 umfassen (Fig. 1), insbesondere solche, welche in Fig. 1 (a) die aus variablen Schwerketten-Sequenzen abgeleiteten Teile CDR3 (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 3), CDR2 (SEQ ID NO: 4) und CDR1 (SEQ ID NO: 5 oder insbesondere SEQ ID NO: 6) und (b) die aus variablen Leichtketten-Sequenzen abgeleiteten der CDR1' (SEQ ID NO: 7), CDR2' (SEQ ID NO: 8) und CDR3' (SEQ ID NO: 9) umfassen. Möglich sind auch solche Antikörper, bei denen diese CDR durch andere als die in Fig. 1 gezeigten Gerüstregionen (FR) voneinander separiert sind.

[0025] Die Erfindung betrifft auch natives gp96 bindende Antikörper, die Varianten der als bevorzugt gekennzeichneten Sequenzen beinhalten, z. B. Varianten, die aus einer DNA resultieren, die einer in-vitro-Mutagenese unterworfen worden sind, wobei die Bedingung ist, dass diese noch die genannte Bindungsfähigkeit besitzen, insbesondere bei üblichen Messmethoden zur Affinitätsbestimmung mindestens zweimal, vorzugsweise mindestens 10-mal stärkere Affinität zu leicht denaturiertem oder insbesondere nativem gp96 haben als der Antikörper SPA-850, der eine primäre (Sequenz-) Struktur des gp96 erkennt, die sowohl in nativem als auch in denaturiertem gp96 vorhanden ist und so nicht selektiv ist für natives gp96. (s. u.). Solche Modifikationen können in einer Addition, Substitution oder Deletion von Aminosäuren, vorzugsweise von bis zu 5, beispielsweise von einer Aminosäure, bestehen – besonders bevorzugt sind solche rekombinanten Antikörper, die eine optimale Affinität haben, die hoch genug ist für starke gp96-Bindung, aber dennoch wieder die Freisetzung desselben aus gp96/Antikörperkomplexen erlaubt, um so das gebundene gp96 wieder freisetzen zu können, was z. B. für die unten beschriebenen Reinigungsmethoden essentiell ist. Soweit die Modifikationen die CDR be-

treffen, sind konservative Austausche bevorzugt, z. B. der Austausch einer hydrophoben Aminosäure durch eine andere, einer sauren durch eine andere, einer basischen durch eine andere, von Ser durch Thr, einer aromatischen durch eine andere oder dergleichen, oder ferner Addition einer homologen Aminosäure, so dass eine Aminosäure durch zwei homologe Aminosäuren ersetzt wird, oder Deletion einer Aminosäure.

[0026] Daneben können vorzugsweise noch Gerüstregionen FR (wie z. B. die in Fig. 1 gezeigten FR1 bis FR4 auf der schweren Kette, FR1' bis FR4' auf der leichten Kette, oder andere Aminosäuresequenzen, die die Fähigkeit der Antikörper zur Bindung an leicht denaturiertes oder insbesondere natives gp96 haben) vorliegen.

[0027] Besonders bevorzugte rekombinante Antikörper sind solche, die mindestens eine der Sequenzen für die variablen Teile der schweren Ketten gemäss Fig. 1 für einen der Klone G12D, H11B oder B10C (SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; oder SEQ ID NO: 12), insbesondere die Mutante mit einer CDR 1 der Sequenz DYYMY (SEQ ID NO: 6), welche bei der in den Beispielen beschriebenen Methode nicht erwartet werden konnte, also die Sequenz für den variablen Abschnitt einer schweren Kette des Klons H11B (SEQ ID NO: 12); und die Sequenz für den variablen Abschnitt der leichten Kette gemäss Fig. 1 (SEQ ID NO: 13) umfassen, welche erforderlichenfalls durch einen geeigneten Spacerabschnitt voneinander getrennt sind.

[0028] Natives gp96 ist solches, das dem in der Zelle normalerweise im ER vorliegenden in der Konformation im wesentlichen entspricht und noch in der Lage ist, die unter physiologischen Bedingungen gebundenen antigenen Peptide zu binden, so dass diese im Komplex mit gp96 isoliert werden können – mit anderen Worten, die 3D-Faltung ist soweit erhalten (oder sogar unverändert), daß die Beladung mit den antigenen Peptiden noch möglich ist, auch bei Reinigung des gp96 wie unten als Teil der Erfindung beschrieben – im Gegensatz hierzu scheint die klassische Methode nach Srivastava, METHODS: A Companion to Methods in Enzymology 12, 165–171 (1997) mindestens auch beträchtliche denaturierte Anteile zu enthalten.

[0029] Die Reinigung von gp96 gelingt nach üblichen Methoden, beispielsweise durch Präzipitation des gp96 aus Lösungen, wie Zelllysaten, sofern mindestens zwei Bindungsstellen pro rekombinantem Antikörper für gp96 vorliegen oder Aggregate von solchen rekombinanten Antikörpern vorliegen, oder wenn weiter Anti-Antikörper eingesetzt werden, die mehr als eine Bindungsstelle für Sequenzen auf den erfindungsgemässen rekombinanten Antikörpern (beispielsweise c-myc-Sequenzen) haben und so zur Vernetzung in der Lage sind, insbesondere, wenn die Anti-Antikörper polyklonal sind; bevorzugt ist die Reinigung nach Bindung eines erfindungsgemässen Antikörpers an ein geeignetes partikuläres Trägermaterial mit ausreichend grosser Oberfläche, z. B. an eine auf Kohlenhydraten oder Kunststoffen basierende Gelmatrix, wie insbesondere Sepharose. Die Reinigung kann dann durch Bindung in Suspension oder durch Auftragen der zu reinigenden Probe auf eine Säule, die mit einer gebundenen rekombinanten Antikörper umfassenden Matrix gefüllt ist, erfolgen. Möglich ist auch die Bindung an Membranen, z. B. Nitrozellulose, die mit dem entsprechenden rekombinanten Antikörper belegt sind, oder entsprechende andere Trägermaterialien. Die Elution des so gebundenen gp96 erfolgt mit geeigneten Lösungen, insbesondere mit leicht basischen (pH vorzugsweise zwischen 7,2 und 12, insbesondere zwischen 7,2 und 10,5; eingestellt beispielsweise mit Hilfe organischer Basen, insbesondere Stickstoffbasen, wie Triethanolamin) und/ oder salzhaltigen Eluenten, insbesondere 0,3 bis 4, vorzugsweise 0,5 bis 1,5 M Salzlösungen, wie 0,7 bis 1,5 M Salzlösung, vorzugsweise mit Kochsalz (NaCl) als Salz. Sollen native Komplexe aus gp96 und daran gebundenen Peptiden (z. B. aus geschädigten Geweben, wie ischämischen Geweben oder Geweben mit Krankheitserregern oder Krebsmarkern) isoliert werden, so wird vorzugsweise ein pH im Bereich zwischen 6 und 8 gewählt und eine erhöhte Salzkonzentration, insbesondere 0,7 bis 1,5 M Kochsalzlösung in Gegenwart von Puffer, wie Phosphatpuffer.

[0030] Die Markierung (d. h., qualitative oder quantitative Bestimmung) von gp96 kann beispielsweise mit üblichen Assays zum Nachweis von Antigenen mit Antikörpern durchgeführt werden. So können die erfindungsgemässen rekombinanten Antikörper vorzugsweise selbst direkt Sequenzen enthalten, die eine Markierung ermöglichen (beispielsweise Sequenzabschnitte, die Enzymfunktion haben und so direkt durch Umsetzung mit entsprechenden Substraten die Detektion ermöglichen, oder durch dagegen gerichtete Antikörper erkannt werden können, die ihrerseits durch Standardmethoden nachgewiesen werden können), beispielsweise als Phosphatase, z. B. alkalische Phosphatase aus *E. coli* oder alkalische Phosphatase aus Säugetieren (z. B. aus Rind), Peroxidasen, wie Meerettichperoxidase (mit z. B. 4-Chlor-1-naphthol oder 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin als Substrat), β -D-Galactosidase, Glucoseoxidase, Glucoamylase, Carboanhydrase, Acetylcholinesterase, Lysozym, Malatdehydrogenase oder Glucose-6-phosphatase; ein Molekül mit spezifischen Bindungseigenschaften, wie Streptavidin, das an Biotin bindet, oder andere charakteristische antigene Abschnitte, wie c-myc-Sequenzen oder -teilsequenzen, die insbesondere immunologisch nachgewiesen werden können.

[0031] Auf diese Weise können die mit Antikörpern üblichen Nachweismethoden für Antigene ("Immunoassays"), insbesondere Radioimmunoassays und vor allem Immunfluoreszenzmarkierung, Immunoblotting, Enzym-Immunoassays, insbesondere EIA oder ELISA, oder Dot-Assays durchgeführt werden, um gp96 qualitativ und/oder quantitativ nachzuweisen.

[0032] Die rasche Reinigung gelingt vorzugsweise durch Auftrennung eines (erforderlichenfalls durch Ultrazentrifugation vorgeklärten) Zelllysates über eine Säule, die mit einer Matrix beladen ist, die gebundene rekombinante Antikörper gemäss der Erfindung trägt (siehe oben unter Reinigung, dort werden auch geeignete Elutionsbedingungen angegeben), insbesondere über entsprechend modifizierte Sepharose. Zunächst wird aufgetragen, dann Verunreinigungen ausgewaschen, und zuletzt eluiert, wie oben für die Reinigung von gp96 beschrieben.

[0033] Die Immunotherapie bedient sich des so gewonnenen gp96, das im wesentlichen in nativer Form vorliegt, wenn entsprechende Elutionsbedingungen gewählt werden (siehe oben oder in den Beispielen), und noch gebundene Peptide aus den Tumorzellen oder den infizierten Zellen vorliegen, die charakteristisch für Krankheitszustände, wie Ischämien, Krebs oder Infektionen sind. Im Prinzip ist auch heterologe Immunotherapie möglich, beispielsweise, wenn mehrere Patienten durch das gleiche Pathogen infiziert sind oder die gleiche Tumorerkrankung haben.

[0034] "Tumorerkrankung" bedeutet eine proliferative Erkrankung, beispielsweise solide Tumoren oder Blutkrebs, einschliesslich ggf. vorliegender Metastasen. Die zur Isolierung des gp96 verwendeten Zellen sollten dann insbesondere Tumorzellen umfassen. "Infiziert" bedeutet, dass die entsprechenden Zellen durch einen Mikroorganismus, wie ein Virus, Bakterien, Mycoplasmen, einen Pilz oder einen Parasiten, wie Protozoen, infiziert sind.

[0035] Die Immuntherapie erfolgt durch enterale (z. B. nasale) oder vorzugsweise durch parenterale, insbesondere intramuskuläre, subkutane oder ferner intrakraniale oder intralumbale Verabreichung eines wie oben beschrieben gereinigten gp96/Peptid-Komplexes an einen Patienten, vorzugsweise einen solchen, der einer solchen Behandlung bedarf, in Abwesenheit oder Gegenwart von weiteren Adjuvantien, wie Aluminiumhydroxid, Lysolecithin, Pluronic-Polyolen, Polyanionen, Peptiden, Muramyl-di- oder -tripeptiden, Squalenmischungen (SAF-1), Saponinderivaten, Zellwandpräparationen von Mycobakterien, Quil A, Untereinheit B aus Cholera-toxin, Proteine oder Ölemulsionen, oder Kombinationen von zwei oder mehr davon.

[0036] Die Erfindung betrifft somit auch die Verwendung der erfindungsgemässen rekombinanten Antikörper zur Reinigung von gp96 aus Zellen oder Gewebeproben insbesondere aus einem Patienten, der an einer Erkrankung, wie einer Ischämie (z. B. infolge eines Infarktes), einem Tumor oder einer Infektion leidet, und (vor allem im Falle einer Infektion oder einer Tumorerkrankung) die nachfolgende Verabreichung des so gewonnenen gp96 an einen Patienten, insbesondere einen, der einer derartigen Behandlung bedarf, zur autologen oder ferner heterologen Immunisierung.

[0037] Die Erfindung betrifft auch gp96 mit gebundenen Peptiden, welches durch die oben beschriebene Reinigungsmethode gewinnbar ist bzw. vorzugsweise gewonnen worden ist, insbesondere zur Anwendung in einem Verfahren zur (vorzugsweise autologen) Immunisierung, sowie pharmazeutische Formulierungen, die ein nach der oben beschriebenen Reinigungsmethode gewinnbaren, insbesondere gewonnenen, gp96/Peptid-Komplex und ggf. weitere Trägermaterialien umfassen. Als Trägermaterialien kommen insbesondere physiologisch annehmbare Trägermaterialien in Frage, insbesondere physiologische Kochsalzlösung, Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung, steriles Wasser und ggf. Adjuvantien, wie oben genannt, in Frage. Andere Pufferungs- und dispergierend wirksame Trägermaterialien können verwendet werden. Der Fachmann kennt die möglichen Zusammensetzungen, Beispiele finden sich in Remington's Pharmaceutical Sciences (Alfonso R. Gennaro, Hrg., 18th Edition, 1990), hiermit durch Bezugnahme inkorporiert. Die Zusammensetzungen werden nach üblichen Methoden sterilisiert und verpackt, z. B. in Ampullen oder Gläsern, oder direkt verabreicht. Die Konzentration an gp96/Peptidkomplex kann variieren, beispielsweise von ca. 0,001 bis 20 Gew.-%, vorzugsweise von 0,01 bis 0,5%.

[0038] Als "Patienten" kommen vor allem Warmblüter, in erster Linie Säuger, vor allem der Mensch, in Betracht.

[0039] Bei der Administration wird eine Dosis verabreicht, die normalerweise zum Stimulieren einer Immunantwort (insbesondere basierend auf cytotoxischen T-Lymphozyten) geeignet ist. Die Dosis ist abhängig von den individuellen Patientenparametern wie Grösse, Alter, Geschlecht und Zustand, wird sich aber normalerweise vorzugsweise im Bereich von 0,001 bis 20 000 µg, vorzugsweise 0,005 bis 4000 µg gp96/Peptidkomplex pro kg Patientengewicht bewegen.

[0040] Es ist auch möglich, mit erfindungsgemässen rekombinanten Antikörpern Warmblüter zu immunisieren, um so Anti-Idiotyp-Antikörper, die antigene Bereiche von gp96 imitieren, herzustellen. Die Immunisierung erfolgt analog wie oben für gp96/Peptidkomplexe beschrieben.

[0041] Die Isolierung von Peptiden, welche an natives gp96 aus Warmblüterzellen gebunden sind, insbesondere bei Warmblütern, die an einer Erkrankung leiden, z. B. einer Ischämie (etwa infolge eines Infarktes), einer Tumorerkrankung oder einer Infektion, ist möglich, indem man erfindungsgemäss isoliertes natives gp96, das solche Peptide gebunden hat, aus entsprechenden gp96/Peptidkomplexen freisetzt (z. B. durch Änderung der Ionenstärke, Erhöhung der Basizität, beispielsweise mittels Stickstoffbasen, wie Triethanolamin, auf einen pH-Wert zwischen 7,4 und 12, vorzugsweise zwischen 9 und 11,5), und erforderlichenfalls beispielsweise durch Gelfiltration vom gp96 trennt. Die Peptide können dann weiter untersucht (z. B. sequenziert) werden und auf ihre biologischen Wirkungen untersucht werden (z. B. Immunogenität) und so auch das Erkennen pathogener Mechanismen, beispielsweise bei Ischämie, ermöglichen. Soweit sie neu sind, sind auch entsprechende Peptide Gegenstand der vorliegenden Erfindung, sowie deren Verwendung, beispielsweise in Immunisierungsprotokollen.

[0042] Als Vorrichtung zur Reinigung sind insbesondere chromatographische Säulen zu nennen, die mit einer Matrix gefüllt sind, welche einen erfindungsgemässen rekombinanten Antikörper umfasst. Für die Herstellung der Matrix finden insbesondere solche Grundmatrices mit funktionellen Gruppen, wie Hydroxy-, Carboxy-, Amino-, Epoxy-, Dien- oder Mercaptogruppen, die eine Kopplung mit einem erfindungsgemässen Antikörper erlauben, insbesondere solche auf Polymerbasis, wie auf Basis von Polyacryl oder Polyacrylderivaten (insbesondere Oxiran-modifiziert), wie im Falle von Eupergit (Röhm Pharma, Darmstadt) oder insbesondere auf Basis aktivierter polymerer Kohlenhydrate, wie cyanogenbromid-aktivierter Sepharose (vor allem Sepharose 4, 4B oder 6MB), Verwendung. Entsprechend sind die antikörpermodifizierten Matrices gemäss der Erfindung auf der Basis von Polymeren, wie Polyacryl oder dessen Derivaten (z. B. Eupergit), oder auf der Basis polymerer Kohlenhydrate aufgebaut, welche erfindungsgemässe Antikörper (vorzugsweise kovalent gebunden) tragen. Eine geeignete Säule hat insbesondere ein inneres Volumen (inklusive Säulenmaterial) von 0,01 bis 10 ml, z. B. von 0,05 bis 5 ml, beispielsweise von 0,05 bis 0,1 ml. Weitere zur Vorrichtung gehörige Komponenten können z. B. Schläuche, Vorratsgefässe für Eluenten und Waschlösungen und dergleichen sein. Eine Matrix (Trägermaterial), wie oben beschrieben – insbesondere Sepharose – die einen erfindungsgemässen Antikörper trägt, insbesondere, wenn dieser kovalent gebunden ist, ist selbst Gegenstand der Erfindung. Vorzugsweise umfasst eine entsprechende Vorrichtung auch eine Säule, die eine mit einem unspezifischen Material, insbesondere Serumalbumin, wie Rinderse- rumalbumin, belegte Matrix (wie oben beschrieben, jedoch mit einem anderen Liganden als dem rekombinanten Antikörper), die zur Vorreinigung geeignet ist (als Vorsäule) und vorzugsweise direkt der eigentlichen, mit dem rekombinanten Antikörper belegten Säule vorgeschaltet ist.

[0043] Kits zur Reinigung oder zum Nachweis von nativem gp96, welche die erfindungsgemässen rekombinanten Antikörper umfassen, sind insbesondere solche, die eine wie im letzten Absatz beschriebene chromatographische Säule und erforderliche weitere Komponenten, wie eine ebenfalls vorstehend beschriebene Vorsäule und ggf. Puffersalze oder Pufferlösungen, Eluenten, oder dergleichen, und gewünschtenfalls auch Nachweissysteme für isoliertes natives gp96 oder daran gebundene Peptide, wie Komponenten entsprechender Immunoassays oder dergleichen, enthalten können, z. B. Antikörper gegen c-myc, Anti-Antikörper gegen diese Antikörper, die z. B. mit einem Enzym als Komponente eines enzymatischen Nachweissystems, wie einer Peroxidase, markiert sind, sowie entsprechende Reagenzlösungen und Substrate für diese Enzyme.

[0044] Die Erfindung betrifft auch Nucleinsäuresequenzen, insbesondere DNA-Sequenzen, welche für erfindungsgemässe rekombinante Antikörper kodieren. Bevorzugt sind solche Nucleinsäuresequenzen, die als für den variablen Abschnitt einer schweren Kette codierende Nucleinsäuresequenz eine der in Fig. 2 und deren Legende für die CDR 3 aus den Klons B10C (SEQ ID NO: 23), G12D (SEQ ID NO: 24) oder H11B (SEQ ID NO: 25) genannten umfassen, und/oder als für den variablen Abschnitt einer leichten Kette codierende Nucleinsäuresequenz die für die CDR3' in Fig. 2 und deren Legende gezeigte (SEQ ID NO: 22) umfassen, wie in Klammer jeweils vorstehend angegeben; sowie jeweils beliebige für Gerüstregionen codierende Sequenzen FR1 bis FR4 und FR1' bis FR4'.

[0045] Bevorzugt sind insbesondere solche Nucleinsäuresequenzen, die als für den variablen Abschnitt einer schweren Kette codierende Nucleinsäuresequenzen für die CDR1 eine der in Fig. 2 und deren Legende mit SEQ ID NO: 18 oder insbesondere SEQ ID NO: 19 genannten Sequenzen umfassen, für die CDR2 die Sequenz gemäss SEQ ID NO: 17 und für die CDR3 eine der Sequenzen gemäss SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 und SEQ ID NO: 16, und/oder als für den variablen Abschnitt einer leichten Kette codierende Nucleinsäuresequenz die für die CDR1' gemäss SEQ ID NO: 20, für die CDR2' gemäss SEQ ID NO: 21 und für die CDR3' gemäss SEQ ID NO: 22 in Fig. 2 und deren Legende gezeigten Sequenzen umfassen; sowie jeweils beliebige für Gerüstregionen codierende Sequenzen FR1 bis FR4 und FR1' bis FR4', insbesondere die in Fig. 2 und deren Legende genannten.

[0046] Am stärksten bevorzugt sind solche Nucleinsäuresequenzen, welche als für den variablen Teil der schweren Kette codierende Sequenz die in Fig. 2 gezeigte des Klons S10C (SEQ ID NO: 23), des Klons G12D (SEQ ID NO: 24) oder insbesondere des Klons H11B (SEQ ID NO: 25) umfassen und/oder als für den variablen Teil der leichten Kette codierende Sequenz die in Fig. 2 für alle Klone gezeigte (SEQ ID NO: 26).

[0047] Bei allen Ausführungsformen sind solche der oben genannten Nucleinsäuresequenzen besonders bevorzugt, bei denen die für die variablen Abschnitte der schweren und der leichten Kette codierenden Sequenzen in ein und demselben Nucleinsäurestrang umfasst sind (Codierung für Einzelketten-Antikörper).

[0048] Besonders bevorzugt sind jeweils solche Nucleinsäuresequenzen, die ferner für noch weitere Sequenzen, wie Gerüstsequenzen, Linker-Sequenzen, Marker-Sequenzen (z. B. c-myc) oder Sequenzen, die eine spezifische Trennung erlauben, z. B. für IMAC (Immobilisiertes Metall-Affinitätschromatographie), codierende Sequenzabschnitte umfassen.

[0049] Neben den gezeigten Nucleinsäuresequenzen können auch alle Varianten vorliegen, die durch Ersetzung von Nucleinsäuren im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes oder des wobbling für dieselben Aminosäuren codieren, sowie ferner solche Sequenzen, die für die oben beschriebenen möglichen Abweichungen der Aminosäuren codieren.

[0050] Zu den erfindungsgemässen Nucleinsäuresequenzen zählen auch solche, die für die oben für Antikörper, die Varianten der als bevorzugt gekennzeichneten Sequenzen beinhalten, genannten Aminosäuredeletionen, -insertionen oder -substitutionen codieren, also selbst entsprechende Deletionen, Insertionen oder Substitutionen von Nucleinsäuren enthalten. Insbesondere sind bis zu 15, vorzugsweise bis zu 3 Nucleinsäuren variiert (deletiert, inseriert oder substituiert).

[0051] Ebenfalls bevorzugt sind Vektoren, wie Plasmide, Cosmide oder dergleichen, die eine der genannten Sequenzen umfassen und in geeigneten Wirtszellen zur Expression bringen können. Ein bevorzugter Vektor basiert auf dem Vektor pHEN1 oder pHOG21 (siehe Beispiele).

[0052] Als Wirtszellen kommen solche in Betracht, welche in vitro kultivierbar sind. Geeignet sind eukaryotische oder insbesondere prokaryotische Zellen, z. B. Hefen, wie *Saccharomyces cerevisiae*, Säugetierzellen, Hybridome oder insbesondere Bakterien, wie *E. coli*, welche durch geeignete Vektoren transformiert sind. Für die Herstellung glykosylierter Antikörper sind eukaryotische Wirtszellen erforderlich, für die Herstellung von Einstrang-Antikörpern sind besonders Bakterien gut geeignet. Beispiele für Bakterien sind insbesondere solche, die arm an Restriktions- oder Modifikationsenzymen sind, wie *E. coli*, z. B. *E. coli* X776, *E. coli* TG1 oder insbesondere *E. coli* XL1-Blue (Stratagene).

[0053] Besonders bevorzugt als solche oder zum Einsatz bei allen vorstehend genannten Aspekten der Erfindung sind: Leicht denaturiertes oder insbesondere natives gp96 bindende sc (Einzelketten)-Fv-Antikörper oder Aggregate von zwei oder mehr davon, bei denen je der variable Teil einer leichten Kette und der einer schweren Kette innerhalb ein und derselben Peptidsequenz vorliegen, insbesondere in der Reihenfolge (variabler Teil der schweren Kette, z. B. Sequenz Anfang FR1 bis Ende FR4 in Fig. 1) – (Peptidlinker, z. B. Gly-Ser-Peptidlinker) – (variabler Teil der leichten Kette, z. B. Sequenz Anfang FR1' bis Ende FR4' in Fig. 1) – (c-myc-Marker-Sequenz) – (His-Marker mit mehreren Histidinresten in Folge; z. B. 6 × His).

[0054] Die Herstellung der Antikörper, Wirtszellen (inkl. Kultivierung und Transformation), markierten Antikörper, Vorrichtungen, etc. erfolgt nach an sich bekannten Verfahren, beispielsweise analog zu den in den Beispielen genannten Verfahren.

[0055] Besonders bevorzugt sind die in den Beispielen genannten leicht denaturiertes oder natives GP96 bindenden Antikörper, Verfahren, Vektoren und Vorrichtungen.

[0056] Die nachfolgenden Beispiele dienen der Illustration der Erfindung, ohne ihren Umfang einschränken zu sollen: Mäuse und Antikörper: C57BL/6-Mäuse sind von Charles River WIGA (Sulzfeld, Deutschland). BALB.B-Mäuse sind von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland). Beide Maustypen werden in den Tieranlagen des Instituts für Zellbiologie, Tübingen, Deutschland, gehalten. Die Monoklonalen Antikörper gegen gp96 (anti-Grp94, SPA-850, Klon 9G10) und gegen BiP (SPA-827, Klon 10C3) sind von StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, BC, Canada. Zellkultur und CTL-Assay: Die Mauszelllinie IGELa2 und die humanen C1R-Zelllinien sind von ATCC, Rockville, MD, USA; sie werden in RPMI 1640, enthaltend 10% Fetales Kälberserum und supplementiert mit 0,3 mg/ml L-Glutamin. Penicillin/Streptomycin (100 Einheiten/ml) und 2-Mercaptoethanol (2 µl/ml) kultiviert. CTL-Linien werden erhalten durch wöchentliche Stimulationen mit (mittels einer Cäsium-γ-Strahlenquelle) bestrahlten Milz-Zellen aus BALB.B-Mäusen. CTL-Assays werden wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (Arnold et al., J. Exp. Med. 182, 885–889 (1995)) unter Verwendung von ConA Blasts (Concanavalin A-aktivierte T-Zellen) aus Milzzellen als Zielzellen. Auch Con A Blasts werden ebenfalls wie in der zuletzt genannten Publikation beschrieben hergestellt.

[0057] Die Standard-Methode zur Reinigung von gp96 wird beschrieben in P. K. Srivastava, METHODS: A Companion to Methods Enzymol. 12, 165–71 (1997) und umfasst die Reinigung mittels ConA-Sepharose- und MonoQ-Anio-

enaustausch-Chromatographie.

Beispiel 1

Herstellung rekombinanter Einzelketten-Fv (scFv)-Anti-gp96-Antikörper

[0058] Eine semisynthetische Phagendisplay-Bibliothek, welche aus 50 verschiedenen humanen Keimbahngen für schwere Ketten mit in der Sequenz randomisierten CDR3-Schleifen und einem konstanten humanen $V_{\lambda}3$ -Gen einer leichten Kette besteht und eine Komplexizität von mehr als 10^8 Klonen hat (Nissim et al., EMBO. J 13, 692-698 (1997)), findet Verwendung zur Selektion von Einzelketten-Fv(scFv)-Antikörpern (Abs). Für die Herstellung der Bibliothek werden synthetische CDR3-Schleifen, welche randomisierte Sequenzen von 4-12 Aminosäuren haben, in 50 variable Abschnitte aus schweren Ketten eingefügt. Anschliessend wird das erhaltene Repertoire an Abschnitten aus schweren Ketten in den Phagemid-Vektor pHEN1 (siehe Hoogenboom et al., Nucleic Acids Res. 19, 4133-4137 (1991)) mit dem unmutierten, umgeordneten $V_{\lambda}3$ -Leichtketten IGLV3S1/DPL16 (siehe Frippat et al., Nucl. Acids Res. 18, 7134 (1990) und Williams et al., Eur. J. Immunol. 23, 1456-1461 (1993)) eingebaut. Nach Herstellung scFv-exprimierender Phagenpartikel in E. coli TG1 werden 5×10^{12} koloniebildende Einheiten (c.f.u.) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS; 150 mM NaCl, 150 mM Natriumphosphat, pH 7.2) mit 2% Magermilchpulver (MPBS) in Nunc Maxisorb-Immunröhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark), die mit 80 µg gp96 aus Maus (mgp96) beschichtet sind, zum Panning eingeführt. Unspezifisch gebundene Phagen werden durch intensives Waschen entfernt. Spezifische Phagen werden mit 100 mM Triethylamin (pH12) eluiert und nach Neutralisation expandiert und für weitere Selektionsschritte, bis insgesamt vier davon durchgeführt sind, verwendet. Die Bindungsspezifität wird durch ELISA ermittelt: Mikrotiterplatten werden mit mgp96 beschichtet (0,5 µg/Bohrung), mit 2% Magermilchpulver-Lösung blockiert und dann mit Phagenpartikeln (10^{10} c.f.u.) versetzt. Kommerzieller hältliches polyklonales Hühner-anti-gp96-Serum (1 : 500) dient als positive und PBS als negative Kontrolle. Das System wird durch Zugabe von Kaninchen-anti-M13-Phagen-Antikörper (Stratagene), PO-konjugiertem Ziegen-Antikaninchen-Immunglobulin und Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) entwickelt. Die Absorbanz wird bei 620 nm gemessen (Selektierte Phagen nach der vierten Selektion: $A_{620nm} = 1,406$; negative Kontrolle $A_{620} = 0,065$). Mit jedem Selektionsschritt wird erhöhte Bindungsaktivität festgestellt. Nach der vierten Selektionsrunde werden Einzelkolonien ($n = 77$) hergestellt und die Antikörperdiversität durch Verdauung von Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BstNI ermittelt. Drei Restriktionsmuster werden identifiziert und deren Nucleinsäuresequenzen ermittelt (377 DNA Sequencer, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) (Fig. 2). Drei Antikörperklone mit drei unterschiedlichen CDR3-Regionen (B10C mit Sequenz der CDR3-Region der SEQ ID NO: 1; G12D mit Sequenz der CDR3-Region der SEQ ID NO: 2; und H11B mit Sequenz der CDR3-Region der SEQ ID NO: 3) werden gefunden, siehe Fig. 1. Im ELISA werden die Absorptionen bei 620 nm für Klon B10C zu 1,297, für Klon G12D zu 0,651 und für Klon H11B zu 0,557, für die positive Kontrolle zu 0,557, für die negative Kontrolle zu 0,003 A_{620nm} ermittelt.

Beispiel 2

Herstellung von löslichen, für natives gp96 spezifischen scFv-Antikörpern

[0059] Die Gensegmente der drei spezifischen scFv-Abs (B10C, G12D und H11B) werden durch NcoI-NotI-Verdau erhalten, in das Plasmid pHOG21 (siehe Kipryanov et al., J. Immunol. Meth. 200, 60-77 (1997)) einligiert und in E. coli XL1-Blue (Stratagene) exprimiert. Die lösliche Fraktion des periplasmatischen Extrakts und der Kulturüberstand werden kombiniert, konzentriert und gegen 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0, dialysiert. Alle der hergestellten scFv Abs enthalten poly-His-Markierungen, welche die Reinigung durch IMAC (Immobilized Metall Affinity Chromatography = Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallen) erlauben. Die Proben werden auf eine Säule des Typs "Chelating Sepharose Fast Flow Column" (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden) aufgetragen, die zuvor mit Ni^{2+} -Ionen beladen und mit Dialysepuffer äquilibriert worden ist. Nach ausgiebigem Waschen wird das gebundene Material mit 250 mM Imidazol eluiert und gegen PBS dialysiert. Die Reinheit wird mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) überprüft (nicht gezeigt).

Beispiel 3

Western-Blot- und Dot-Blot (= Punktautoradioarmin)-Analyse löslicher scFv-Antikörper

[0060] Maus-gp96 (mgp96) wird durch SDS-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen (100 mM β -Mercaptoethanol + 2% Natriumdodecylsulfat = SDS) getrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Für die Dot-Blot-Analyse werden 500 ng mgp96 auf Nitrocellulosemembranen unter nativen (PBS), denaturierenden (2% SDS) oder reduzierenden (100 mM β -Mercaptoethanol) Bedingungen aufgetragen. Sowohl die Western- als auch die Dot-Blotmembranen werden mit 2% MPBS blockiert. Das mgp96 wird mittels Ratten-IgG-anti-Grp94 (SPA-850, StressGen Biotechnologies) und Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-Anti-Ratten-IgG (DAKO, Glostrup, Dänemark) oder mit den scFv-Antikörpern detektiert. Alle scFv Abs tragen einen c-myc-Marker, der die Markierung mit Maus-IgG-Anti-Human-myc (Genosys, The Woodlands, USA) und Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (DAKO) erlaubt. Die Detektion löslicher scFv Abs kann mit einer Reihe von Konzentrationen ermittelt werden (1/1 bis 1/8192). Fig. 3 zeigt die Resultate der Dot-Blot-Analyse. Die gereinigten scFv Abs zeigen bei Analyse auf den mit reduziertem, denaturiertem oder nativen mgp96 markierten Nitrocellulosemembranen nur Bindung an das native Protein (Fig. 3). Die Daten der Western-Blot-Analyse (nicht gezeigt) bestätigen diesen Fund.

Beispiel 4

scFv-Antikörper präzipitieren native gp96-Moleküle

[0061] Testet man die rekombinanten scFv Abs in einem ELISA, so erkennen sie nur gp96 in seiner nativen Form, während der kommerziell erhältliche Monoklonale Antikörper SPA-850 (StressGen Biotechnologies) dies nur kaum tut, was seine Nützlichkeit für die Affinitätsreinigung von gp96 stark einschränkt. Zur Untersuchung der Fähigkeit der rekombinanten scFv Abs, mit nativem gp96 zu interagieren, werden Immunopräzipitationsexperimente nach Lysierung von radioaktiv markierten Zellen in einem hypotonischen Puffer durchgeführt, der es ermöglicht, dass die Proteine in ihrer nativen Konformation verbleiben.

[0062] Hierfür werden Maus-Tumorzelllysate aus IGELa2-Zellen verwendet. 10^7 Zellen werden metabolisch markiert in Gegenwart von ^{35}S -Methionin ($150\ \mu\text{Ci}$) in 10 ml Methionin-freiem RPMI-Medium für 16 Stunden inkubiert. Nach Lyse der Zellen in hypotonischem Puffer (30 mM NaHCO_3 pH 7.1) werden die Lysate über Nacht an Protein G-Sepharose (Amersham PharmaciaBiotech) vor-adsorbiert. Spezifische Monoklonale Antikörper oder scFv-Anti-gp96 Abs und anti-c-myc Abs werden zu den klaren Lysaten in einer Menge von $10\ \mu\text{g/ml}$ zugegeben. Nach 90 min werden die Komplexe mit Protein-G-Sepharose isoliert. In einigen Fällen werden die Lysate mit an Sepharose-Beads gekoppeltem Rinder Serumalbumin (BSA) vorgeklärt und die Kopplung direkt mit BSA-Sepharose als Kontrolle oder mit scFv-anti-gp96 Abs gekoppelt an Sepharose-Beads durchgeführt. Die Immunkomplexe werden wiederholt gewaschen und durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese gewaschen. Die fixierten Gele werden getrocknet und auf einem Phosphorimager-Bildschirm exponiert. Wie nach den vorherigen Ergebnissen zu erwarten, wird von SPA-850 nur eine schwache Bande, die der Molekülgröße von gp96 entspricht, ausgefällt (Fig. 4, Bahn (3)). Im Gegensatz hierzu zeigen die Banden mit erfindungsgemässen scFv Abs starke Ausfällung der gp96-Moleküle (Fig. 4, Bahn (4)). Somit erkennen die rekombinanten erfindungsgemässen Antikörper native gp96-Moleküle viel besser als es ein monoklonaler Antikörper zu tun vermag. Die Klone B10C und G12D zeigen vergleichbare Ergebnisse (nicht gezeigt). Die scFv-anti-gp96 Abs sind auch effizienter bei der Präzipitation von gp96 als ein monoklonaler Antikörper gegen das in Endoplasmatischen Retikulum vorliegende Chaperon BiP, von dem bekannt ist, dass es mit einem unbekannten 40 kDa-Protein und auch mit gp96 kreuzreagiert (Fig. 4, Bahn (2)).

Beispiel 5

Reinigung von gp96 unter Verwendung von scFv-Antikörpern

[0063] Um gp96 in einem Schritt isolieren zu können, wird der scFv-Antikörper H11B an Sepharose-Beads gekoppelt. 5 mg davon oder BSA wird an 0.5 mg Cyanogenbromid-aktivierter Sepharose (Pharmacia) gekoppelt. Das BSA-gekoppelte Material dient als Vorsäule, um unspezifisch bindende Materialien zu entfernen. Vorgeklärte hypotonische Lysate der radioaktiv markierten Maus-Zelllinie IGELa2 werden direkt mit den scFv-Sepharose-Beads inkubiert. 1 ml IGELa2-Zellpellets werden bei 4°C im Dounce-Homogenisator (15–20 Auf- und Abbewegungen) in 20 ml hypotonischem Puffer homogenisiert (siehe Arnold et al., J. Exp. Med. 182, 885–889 (1995)). Die Homogenate werden während 60 min bei $100\,000 \times g$ zentrifugiert und die Überstände auf eine Kontroll-BSA-Sepharose-Säule aufgetragen, die direkt mit der scFv-Anti-gp96-Säule verbunden ist. Beide Säulen sind mit PBS voräquilibriert. Nach ausgiebigem Waschen mit PBS, das 0.5% NaCl enthält, wird gp96 mit 100 mM Natriumacetat (pH 4.5), das 0.15% NaCl enthält; oder 100 mM Diethanolamin (pH 10.5) mit 0.15 M NaCl; oder PBS (pH 7.4) mit 1.3 M NaCl eluiert. Die Fraktionen werden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers SPA-850 (StressGen Biotechnologies) untersucht. Um die ungefähre Konzentration an gp96 zu ermitteln, wird die optische Dichte (OD) bei 280 nm unter Verwendung eines Exkoeffizienten von 1 gemessen.

[0064] Eine stark radioaktiv markierte Bande des Proteins, das nahe an der 94-kDa-Markerbande läuft, zeigt, daß der immobilisierte rekombinante scFv H11B in der Lage ist, gp96 spezifisch zu binden (Fig. 5, (8)). Diese Bande fehlt in der Kontroll-Bahn (7), in der lediglich BSA-Sepharose-Beads zur Immunpräzipitation verwendet werden. Zur Anwendung in einem klinisch anwendbaren gp96-Reinigungsverfahren sollte der rekombinante scFv-Antikörper auch in der Lage sein, humanes gp96 zu erkennen. Um zu testen, ob dies möglich ist, werden die Immunpräzipitationsexperimente mit hypotonen Lysaten menschlicher C1R-Zellen durchgeführt. Im Gegensatz zu immobilisiertem BSA (5) ist immobilisierter scFv-H11B-Antikörper fähig, humane gp96-Moleküle zu binden (6). Der Unterschied in den Intensitäten zwischen der Maus- und der Human-Bande in Fig. 5 kann durch die höheren Expressionsspiegel (Konzentrationen) von gp96 in IGELa2-Zellen im Vergleich zu C1R-Zellen erklärt werden (nicht gezeigt).

[0065] Auch immobilisierte B10C- oder G12D-scFv-Antikörper fällen Maus- und Human-gp96 in der gleichen Weise.

Beispiel 6

Aktivierung von CTLs (Cytotoxische T-Lymphozyten durch scFv-gereinigtes gp96 in vivo

[0066] Da native gp96-Moleküle durch die immobilisierten scFv-Abs erkannt werden, wird untersucht, ob sie immer noch mit antigenen Peptiden assoziiert sind und in der Lage sind, spezifische Immunantworten zu induzieren. 8 bis 10 Wochen alte C57BL/6-Mäuse werden mit $30\ \mu\text{g}$ aus IGELa2-Zellen unter Verwendung von nach der Standard-Methode oder mittels der scFv-anti-gp96-Methode gereinigtem gp96 in 300 μl PBS, oder mit 80 μl Sepharose-Beads (bezogen auf das Beads-Volumen) gekoppelt an BSA oder an scFv, welches an gp96 komplexiert ist, in 300 μl PBS immunisiert. 10 Tage später werden die Milzen entfernt und die Splenocyten mit bestrahlten (33Gy) Milzzellen aus BALB.B-Mäusen während 5 Tagen stimuliert.

[0067] Beispielsweise werden Sepharose-Säulen, die mit rekombinantem scFv Antikörper gekoppelt sind, mit den hy-

potonen Lysaten aus IGELa2-Zellen (die aus BALB/c-Mäusen stammen und H2^d exprimieren) beladen und die gp96/scFv-Sepharose-Beads in C57BL/6-Mäuse injiziert. 10 Tage nach der Immunisierung werden die rezipierenden Splenocyten mit bestrahlten BALB.B-Milzzellen (des H2^b-Haplotyps) stimuliert. Da Mäuse mit BALB-Herkunft sich von C57BL/6-Mäusen an mehreren Minor-H-Genen unterscheiden und gp96 in der Lage ist, ein Cross-Priming zu induzieren (siehe Arnold et al., J. Exp. Med. 182, 885-889 (1995), und J. Exp. Med. 186, 461-466 (1997)), sollte eine Immunisierung der C57BL/6-Mäuse mit BALB/c-deriviertem gp96 die BALB.B-reaktiven CTLs in den Rezipienten aktivieren. Wie in Fig. 6B zu sehen, komplexiert die aus der mit den gp96/scFv-Sepharose-Beads immunisierten Maus erhaltene Kultur solche CTLs, die Minor-H-Antigene zeigen, welche auf BALB.B vorliegen, aber nicht auf C57BL/6-Blasten. Im Kontrollexperiment wird keine CTL-Aktivität gefunden (Fig. 6A). Diese Resultate zeigen, dass affinitätsgereinigtes gp96 immer noch mit antigenen Peptiden assoziiert ist, in diesem Falle mit Minor-H-Antigenen, und dass es in der Lage ist, eine spezifische Immunantwort hervorzurufen.

[0068] Um die Verwendbarkeit für klinische Anwendungen zu überprüfen, wird versucht, gp96-Moleküle aus den Sepharose-Beads unter Aufrechterhaltung ihrer Immunogenität zu eluieren. Mehrere Bedingungen zur Elution der gp96-Moleküle von den Affinitätssäulen werden untersucht. Nur der Diethanolamin-Puffer mit einem pH von 10,5 oder ein Puffer mit hoher Salzkonzentration (1,3 M NaCl) sind in der Lage, gp96-Moleküle erfolgreich freizusetzen, wie durch Dot-Blot-Analyse gezeigt werden kann (nicht gezeigt). Ein Puffer mit pH 4,5 kann gp96 nicht von der H11B-Säule eluieren.

[0069] Um zu testen, ob die eluierten gp96-Moleküle immer noch immunogen sind, werden Cross-Priming-Experimente durch Immunisierung von C57BL/6-Mäusen, jetzt mit chromatographisch gereinigtem IGELa2 gp96, wie durch Elution von den gp96/ScFv-Sepharose-Beads erhalten, durchgeführt. Wie in den Fig. 6C bis 6F gezeigt, sind mit dem Hochsalz-Puffer (1,3 M NaCl) eluierte gp96-Moleküle tatsächlich in der Lage, CTLs zu generieren, die spezifisch Minor-H-Antigene aus BALB.B-Zellen erkennen (Fig. 6F). Die affinitätsgereinigten gp96-Moleküle sind genauso effizient bei der Generierung einer CTL-Antwort wie das gp96, welches aus denselben Maus-IGELa2-Zellen unter Verwendung des Standardprotokolls stammt (Fig. 6D). Dagegen wird bei der Maus mit gp96, das von der scFv-Säule mittels des pH 10,5-Puffers eluiert ist, keine CTL-Antwort festgestellt (Fig. 6E). Dies kann durch den Verlust vom gp96 gebundener Peptide während des Elutionsvorgangs bei basischem pH erklärt werden. Im selben Experiment verursachen nicht immunisierte C57BL/6-Mäuse keine CTL-Antwort (Fig. 6C).

Sequenzprotokoll – freier Text

[0070] SEQ ID NO: 1: Randomisierte CDR3-Schleife als Bestandteil einer schweren Kette eines Antikörpers, siehe Nissim et al. EMBO J. 13(3), 692-98 (1994); SEQ ID NO: 2 und 3: Zufallssequenz für CDR3 einer schweren Kette eines Antikörpers, Herstellung gemäss Nissim et al., 1994. SEQ ID NO: 10 bis 12: Rekombinante Sequenz für variablen Teil der schweren Kette von Antikörpern mit Zufallssequenz für CDR3 (Nissim, 1994); SEQ ID NO: 14 bis 16: Zufallssequenz, codiert für CDR3 einer schweren Kette eines Antikörpers, Herstellung siehe Nissim et al., 1994; SEQ ID NO: 23 bis 25: Rekomb. Sequenz, codiert für variablen Teil der schweren Kette von Antikörpern mit Zufallssequenz für CDR3 (Nissim, 1994).

DE 100 19 967 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Dr. Fenning BioMed GmbH	
<120> Antikörper gegen natives gp96, deren Herstellung und Verwendung	5
<130> P 00292 K DE	
<140>	10
<141>	
<160> 26	
<170> PatentIn Ver. 2.1	15
<210> 1	
<211> 8	
<212> PRT	20
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: randomisierte CDR3-Schleife als Bestandteil einer schweren Kette eines Antikörpers, siehe Nissim et al. (1994)	25
<300>	30
<301> Nissim et al., Ahuva	
<303> EMBO J.	
<304> 1994	
<305> 13(3)	
<306> 692-698	35
<400> 1	
Met Pro Val Ser Gln Met Pro His 1 5	40
<210> 2	
<211> 8	
<212> PRT	45
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Zufallssequenz für CDR3 einer schweren Kette eines Antikörpers, Herstellung gemäss Nissim et al., 1994	50
<300>	55
<301> Nissim et al., Ahuva	
<303> EMBO J.	
<304> 1994	
<305> 13(3)	
<306> 692-698	60
<400> 2	
Ile Pro Leu Phe Gly Arg Asp His 1 5	65

DE 100 19 967 A 1

```

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
5 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
      Zufallssequenz für CDR3 einer schweren Kette eines
10 Antikörpers, Herstellung gemäss Nissim et al.,
      1994

<300>
<301> Nissim et al., Ahuva
15 <303> EMBO J.
    <304> 1994
    <305> 13(3)
    <306> 692-698

20 <400> 3
    Leu Ala Ala Gly Asn
      1                5

25
    <210> 4
    <211> 17
    <212> PRT
30 <213> Homo sapiens

    <300>
    <301> Nissim et al., Ahuva
    <303> EMBO J.
35 <304> 1994
    <305> 13(3)
    <306> 692-698

    <400> 4
40 Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe Gln
    1                5                10                15

    Gly

45

    <210> 5
    <211> 5
50 <212> PRT
    <213> Homo sapiens

    <300>
    <301> Nissim et al., Ahuva
55 <303> EMBO J.
    <304> 1994
    <305> 13(3)
    <306> 692-698

60 <400> 5
    Asp Tyr Tyr Met His
      1                5

65
    <210> 6
    <211> 5

```

DE 100 19 967 A 1

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<300>
<301> Nissim et al., Ahuva
<303> EMBO J.
<304> 1994
<305> 13(3)
<306> 692-698

5

<400> 6
Asp Tyr Met Met Tyr
1 5

10

15

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<300>
<301> Nissim et al., Ahuva
<303> EMBO J.
<304> 1994
<305> 13(3)
<306> 692-698

25

<400> 7
Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
1 5 10

30

35

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

<300>
<301> Nissim et al., Ahuva
<303> EMBO J.
<304> 1994
<305> 13(3)
<306> 692-698

45

<400> 8
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

50

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55

<300>
<301> Nissim et al., Ahuva
<303> EMBO J.
<304> 1994
<305> 13(3)
<306> 692-698

60

<400> 9

65

DE 100 19 967 A 1

Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val Val
 1 5 10

5
 <210> 10
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

10
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: rekombinante
 Sequenz für variablen Teil der schweren Kette von
 15 Antikörpern mit Zufallssequenz für CDR3 (Nissim,
 1994)

<300>
 <301> Nissim et al., Ahuva
 20 <303> EMBO J.
 <304> 1994
 <305> 13(3)
 <306> 692-698

25
 <400> 10
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

30 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

35 Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
 50 55 60

40 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

45 Ala Arg Met Pro Val Ser Gln Met Pro His Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

50 Val Thr Val Ser Arg
 115

55
 <210> 11
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

60
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Rekombinante
 Sequenz für variablen Teil der schweren Kette von
 Antikörpern mit Zufallssequenz für CDR3 (Nissim,
 1994)

65
 <300>
 <301> Nissim et al., Ahuva
 <303> EMBO J.

DE 100 19 967 A 1

<304> 1994
<305> 13(3)
<306> 692-698

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Pro Leu Phe Gly Arg Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Arg
115

<210> 12

<211> 114

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Rekombinante
Sequenz für variablen Teil der schweren Kette von
Antikörpern mit Zufallssequenz für CDR3 (Nissim,
1994)

<300>

<301> Nissim et al., Ahuva

<303> EMBO J.

<304> 1994

<305> 13(3)

<306> 692-698

<400> 12

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30 -

Tyr Met Tyr Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr

7

7

DE 100 19 967 A 1

<305> 13(3)		
<306> 692-698		
<400> 14	24	5
atgccggtta gtcagatgcc tcat		
<210> 15		
<211> 24		10
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		15
Zufallssequenz, codiert für CDR3 einer schweren		
Kette eines Antikörpers, Herstellung siehe Nissim		
et al, 1994		
		20
<300>		
<301> Nissim et al., Ahuva		
<303> EMBO J.		
<304> 1994		
<305> 13(3)		25
<306> 692-698		
<400> 15	24	
attccgttgt ttgggcggga tcat		30
<210> 16		
<211> 15		
<212> DNA		35
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		
Zufallssequenz, codiert für CDR3 einer schweren		40
Kette eines Antikörpers, Herstellung siehe Nissim		
et al, 1994		
<300>		45
<301> Nissim et al., Ahuva		
<303> EMBO J.		
<304> 1994		
<305> 13(3)		
<306> 692-698		50
<400> 16	15	
cttgctgctg gtaat		
		55
<210> 17		
<211> 51		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		60
<300>		
<301> Nissim et al., Ahuva		
<303> EMBO J.		
<304> 1994		65
<305> 13(3)		
<306> 692-698		

DE 100 19 967 A 1

<400> 17
 cttgttgatc ctgaagatgg tgaaacaata tacgcagaga agttccaggg c 51

5
 <210> 18
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10
 <300>
 <301> Nissim et al., Ahuva
 <303> EMBO J.
 <304> 1994
 15 <305> 13(3)
 <306> 692-698

<400> 18
 20 gactactaca tgcac 15

<210> 19
 <211> 15
 25 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300>
 <301> Nissim et al., Ahuva
 30 <303> EMBO J.
 <304> 1994
 <305> 13(3)
 <306> 692-698

35 <400> 19
 gactactaca tgtac 15

40 <210> 20
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

45 <300>
 <301> Nissim et al., Ahuva
 <303> EMBO J.
 <304> 1994
 50 <305> 13(3)
 <306> 692-698

<400> 20
 55 caaggagaca gcctcagaag ctattatgca agc 33

<210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 60 <213> Homo sapiens

<300>
 <301> Nissim et al., Ahuva
 65 <303> EMBO J.
 <304> 1994

<305> 13(3)
 <306> 692-698

<400> 21 21 5
 ggtaaaaaca accggccctc a

<210> 22
 <211> 33 10
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300> 15
 <301> Nissim et al., Ahuva
 <303> EMBO J.
 <304> 1994
 <305> 13(3)
 <306> 692-698 20

<400> 22 33
 aactcccggg acagcagtgg taacccatgtg gta

<210> 23
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz 30

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Rekomb. Se-
 quenz, codiert f. variablen Teil der schweren
 Kette von Antikörper mit Zufallssequenz für CDR3(
 Nissim, 1994) 35

<300>
 <301> Nissim et al., Ahuva
 <303> EMBO J. 40
 <304> 1994
 <305> 13(3)
 <306> 692-698

<400> 23 45
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggctac agtgaaaatc 60
 tcctgcaagg tttctggata caccttcacc gactactaca tgcactgggt gcaacaggcc 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggactt gttgatcctg aagatgggtga aacaatatac 180
 gcagagaagt tccagggcag agtcaccata accgcggaca cgtctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaatgccg 300
 gttagtcaga tgcctcattg gggccaaggt accctgggtca ccgtgtcgag a 351

<210> 24 55
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz -

<220> 60
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Rekomb. Se-
 quenz, codiert f. variablen Teil der schweren
 Kette von Antikörper mit Zufallssequenz für CDR3 (
 Nissim, 1994) 65

<300>

<301> Nissim et al., Ahuva
 <303> EMBO J.
 <304> 1994
 <305> 13(3)
 <306> 692-698

<400> 24
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggctac agtgaaaatc 60
 10 tcttgcaagg tttctggata caccttcacc gactactaca tgcactgggt gcaacaggcc 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggactt gttgacctg aagatgggtga aacaatatac 180
 gcagagaagt tccagggcag agtcaccata accgcggaca cgtctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaattccg 300
 15 ttgtttgggc gggatcattg gggccaaggt accctggtca ccgtgtcgag a 351

<210> 25
 <211> 342
 20 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 25 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Rekombinante
 Sequenz, codiert für variablen Teil der schweren
 Kette eines Antikörpers mit CDR3-Zufallssequenz
 (Nissim)

<300>
 30 <301> Nissim et al., Ahuva
 <303> EMBO J.
 <304> 1994
 <305> 13(3)
 35 <306> 692-698

<400> 25
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggctac agtgaaaatc 60
 40 tcttgcaagg tttctggata caccttcacc gactactaca tgtactgggt gcaacaggcc 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggactt gttgacctg aagatgggtga aacaatatac 180
 gcagagaagt tccagggcag agtcaccata accgcggaca cgtctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagacttgct 300
 gctggttaatt ggggccaagg taccctggtc accgtgtcga ga 342

<210> 26
 <211> 324
 <212> DNA
 50 <213> Homo sapiens

<400> 26
 tetgagctga ctcaggaccc tgctgtgtct gtggccttgg gacagacagt caggatcaca 60
 tgccaaggag acagcctcag aagctattat gcaagctggg accagcagaa gccaggacag 120
 55 gccctgtac ttgtcatcta tggtaaaaac aaccggccct cagggatccc agaccgattc 180
 tctggctcca gctcaggaaa cacagcttcc ttgacctca ctggggctca ggcggaagat 240
 gaggctgact attactgtaa ctcccgggac agcagtggta accatgtggg attcggcgga 300
 gggaccaagc tgaccgtcct aggt 324

Patentansprüche

1. Rekombinante Antikörper, die natives gp96 binden.
2. Antikörper gemäss Anspruch 1, welche die dritte Komplementarität determinierende Region (CDR3) der schweren Kette eines Antikörpers gemäss SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 3 umfassen.
3. Antikörper gemäss einem der Ansprüche 1 und 2, welche (a) die vom variablen Teil der schweren Kette abgeleiteten Abschnitte CDR3 der Sequenz SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 3; CDR2 der Sequenz SEQ ID NO: 4; und CDR1 der Sequenz SEQ ID NO: 5 oder insbesondere SEQ ID NO: 6 und (b) die vom variablen Teil

der schweren Kette abgeleiteten Abschnitte CDR1' mit der Sequenz SEQ ID NO: 7, CDR2' mit der Sequenz SEQ ID NO: 8 und CDR3' mit der SEQ ID NO: 9 umfassen.

4. Antikörper, vorzugsweise Einzelketten-Antikörper, gemäss einem der Ansprüche 1 bis 3, welcher (a) die variable Sequenz der schweren Kette gemäss SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 oder SEQ ID NO: 12 und (b) die variable Sequenz der leichten Sequenz gemäss SEQ ID NO: 23 umfasst, getrennt durch einen Spacer.

5. Verwendung eines rekombinanten Antikörpers gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Reinigung oder Markierung von gp96.

6. Verwendung eines rekombinanten Antikörper gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Reinigung von intakten gp96/Peptid-Komplexen aus kleinen Mengen von Tumormaterial oder infizierten Zellen.

7. Verfahren zur Reinigung von gp96, dadurch gekennzeichnet, dass nach Zentrifugation zur Klärung eines Zellsates ein Trennungsschritt an einer Matrix vorgenommen wird, die gebundene Antikörper gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4 trägt, und anschliessend das gebundene gp96 freigesetzt wird.

8. gp96 mit gebundenen Peptiden, welches nach dem Reinigungsverfahren gemäss Anspruch 7 gewinnbar ist.

9. gp96 mit gebundenen Peptiden nach Anspruch 8 zur Anwendung in einem Verfahren zu therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers, insbesondere zur autologen Immunisierung.

10. Verwendung von gp96 mit gebundenen Peptiden gemäss Anspruch 8 zur Herstellung eines Arzneimittels zur (insbesondere autologen) Immunisierung bei Patienten, die an einer Tumorerkrankung oder einer Infektion leiden.

11. Verwendung von gp96 mit gebundenen Peptiden gemäss Anspruch 8 zur Immunisierung von Patienten.

12. Vorrichtung zur Reinigung von nativem gp96, welche einen rekombinanten Antikörper gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4 umfasst.

13. Kit zur Reinigung oder zum Nachweis von nativem gp96, umfassend einen rekombinanten Antikörper gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4.

14. Nucleinsäuresequenzen, insbesondere DNA-Sequenzen, welche für erfindungsgemässe rekombinante Antikörper gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4 kodieren.

15. Wirtszellen, insbesondere Prokaryonten, wie E. coli, welche für erfindungsgemässe rekombinante Antikörper gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4 codierende Sequenzen umfassen.

16. Eine Matrix, insbesondere Sepharose oder ein Gel auf Polyacrylamidbasis, die einen rekombinanten Antikörper gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4 trägt.

17. Verfahren zur Isolierung von Peptiden, welche an natives gp96 aus Warmblüterzellen, das nach dem Verfahren in Anspruch 7 gewinnbar ist, gebunden sind, insbesondere aus Warmblütern, die an einer Erkrankung leiden.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Variabler Teil Schwere Kette

FR1

Klon B10C: QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFT

Klon G12D: -----

Klon H11B: -----

CDR1

FR2

(B10C)

DYMH

WVQQAPGKGLEWMG

(G12D)

(H11B)

----Y

CDR2

(B10C)

LVDPEDGETIYAEKFQG

(G12D)

(H11B)

FR3

(B10C)

RVTITADTSTDYAMELSSLRSEDYVYYCAR

(G12D)

(H11B)

CDR3

FR4

(B10C)

MPVSQMPH

WGQGLTVTSR (SEQ ID NO: 10)

(G12D)

IPLFGRDH

----- (SEQ ID NO: 11)

(H11B)

LAAG...N

----- (SEQ ID NO: 12)

Variabler Teil Leichte Kette

FR1`

Alle Klone: SELTQDPAVSVALGQTVRITC

CDR1`

FR2`

CDR2`

QGDSLRSYYAS

WYQQKPQAPVLVIY

GKNNRPS

FR3`

CDR3`

GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDYCY NSRDSSGNHVV

FR4`

FGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 13)

FIG. 1

Variabler Teil Schwere Kette

```

FR1
B10C:  CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT
G12D:  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
H11B:  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

GGG GCT ACA GTG AAA ATC TCC TGC AAG GTT TCT GGA TAC ACC TTC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

      CDR1      FR2
ACC GAC TAC TAC ATG CAC TGG GTG CAA CAG GCC CCT GGA AAA GGG CTT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
--- --- --- --- --- TAC --- --- --- --- --- --- --- ---

      CDR2
GAG TGG ATG GGA CTT GTT GAT CCT GAA GAT GGT GAA ACA ATA TAC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

      FR3
GCA GAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACC ATA ACC GCG GAC ACG TCT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

ACA GAC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

      CDR3
ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCA AGA ATG CCG GTT AGT CAG ATG CCT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
      CTT GCT GCT GGT ... ..

FR4
CAT TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC ACC GTG TCG AGA (SEQ ID NO: 23)
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- (SEQ ID NO: 24)
AAT --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- (SEQ ID NO: 25)

```

Variabler Teil Leichte Kette:

```

FR1\
TCT GAG CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA CAG ACA

      CDR1\
GTC AGG ATC ACA TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT TAT GCA AGC

FR2\
TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA CAG GCC CCT GTA CTT GTC ATC TAT GGT
      CDR2\

FR3\
AAA AAC AAC CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA TTC TCT GGC TCC AGC
TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT GGG GCT CAG GCG GAA GAT

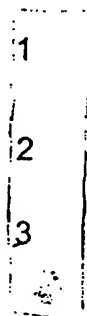
      CDR3\
GAG GCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC CGG GAC AGC AGT GGT AAC CAT GTG

FR4\
GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT (SEQ ID NO: 26)

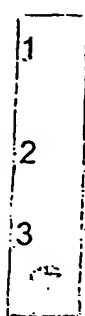
```

FIG. 2

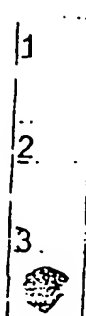
H11B



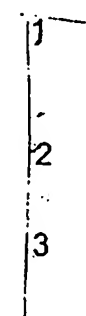
G12D



B10C



neg.ctr.



pos.ctr.

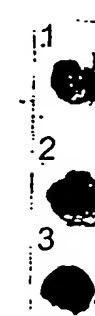


Fig. 3

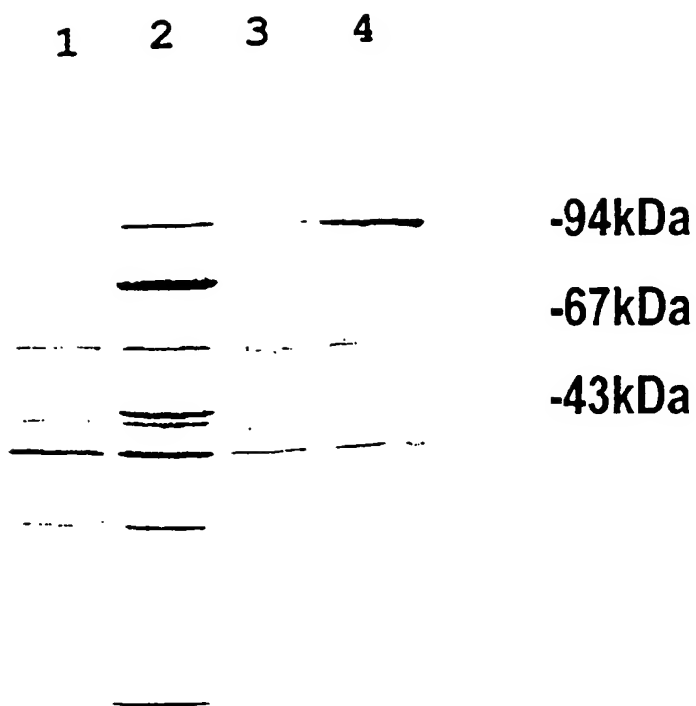


Fig. 4

C1R IGELa2

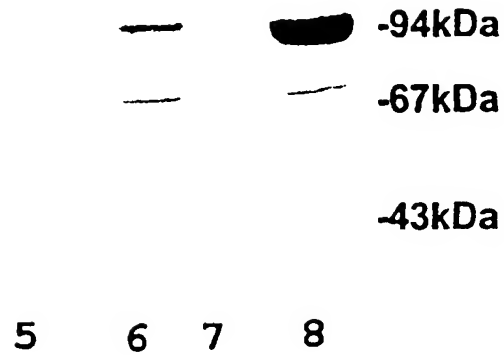
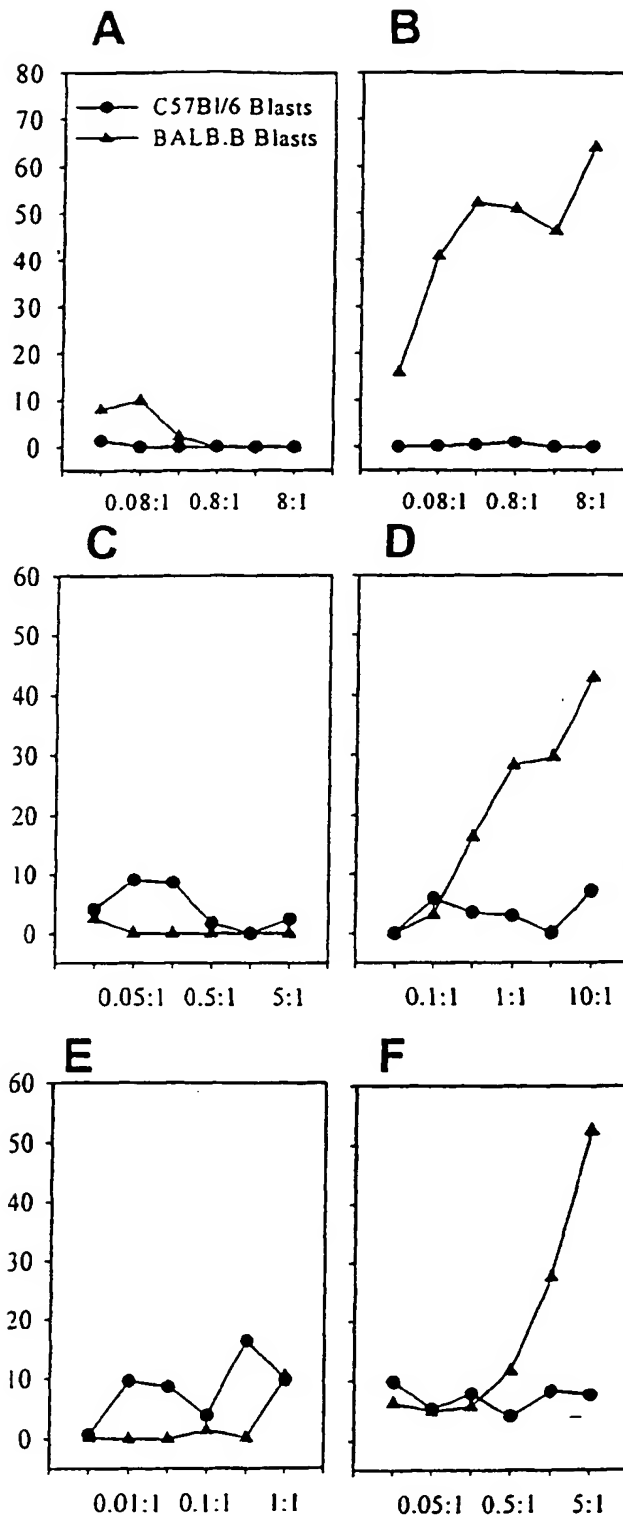


Fig. 5

9



10

Fig. 6

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.